

**ВЛИЯНИЕ МЕЛАТОНИНА НА ПАТОБИОХИМИЧЕСКИЕ ПРОЯВЛЕНИЯ
ВНЕПЕЧЕНОЧНОГО ХОЛЕСТАЗА В ПЕЧЕНИ КРЫС
С ПЕРЕРЕЗАННЫМ ЖЕЛЧНЫМ ПРОТОКОМ**

И.В. Семак, М.В. Антонова, Е.О. Корик

Белорусский государственный университет, г. Минск, Беларусь, semak@bsu.by

Холестаз является обычным исходом целого ряда хронических и острых заболеваний печени [4]. Внутривнутрипеченочный холестаз наблюдается в случае хронического или вирусного гепатита, первичного билиарного цирроза, медикаментозного или алкогольного поражения печени, а также при эндокринных нарушениях во время беременности и менопаузы. Внепеченочный холестаз может быть вызван обтурацией печеночного и общего желчного протока изнутри камнями, опухолью или паразитами. Вне зависимости от происхождения холестаза его пусковым механизмом считается нарушение процессов образования и оттока желчи в кишечник, в результате чего содержание ее компонентов в печени существенно возрастает [4]. Многие из этих соединений, в частности, билирубин и желчные кислоты благодаря своей гидрофобной природе активно взаимодействуют с белками и мембранными структурами, вызывая различного рода нарушения клеточного метаболизма. В частности нами было установлено, что при внепеченочном холестазе нарушаются барьерная функция плазматической мембраны гепатоцитов, белоксинтезирующая и обезвреживающая функции печени, подавляются ферментативные антиперекисные защитные механизмы, интенсифицируются процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ) и в избыточных количествах накапливаются в печени прооксиданты (желчные кислоты, медь и билирубин), что приводит в конечном итоге к развитию окислительного стресса [2,5,6,7,30].

Для коррекции нарушения антиоксидантно-прооксидантного баланса при холестазе достаточно широко используются природные или синтетические антиоксиданты. Однако многие из них, традиционно применяющиеся в медицинской практике (витамины А,С,Е и каротин), оказываются малоэффективными при патологиях, при которых рост интенсивности свободнорадикальных реакций сопровождается подавлением антиоксидантной защиты [27]. Более того, в присутствии меди (Cu) такие широко применяемые антиоксиданты как флавоноиды, токоферолы и аскорбиновая кислота проявляют выраженные прооксидантные свойства [31]. Поэтому поиск природных соединений, не оказывающих прооксидантного действия и обладающих наряду с

собственной антиоксидантной активностью способностью модулировать функционирование антиоксидантной системы, по прежнему сохраняет свою актуальность.

Значительный интерес с точки зрения антиоксидантной терапии представляет мощный антиоксидант мелатонин (N-ацетил-5-метокситриптамин). У млекопитающих мелатонин синтезируется главным образом в эпифизе. Кроме того, мелатонин обнаружен во многих лекарственных растениях, причем его содержание в отдельных случаях достигает 1000 нг на грамм сухого веса растительного сырья [14]. Мелатонин, экзогенного или эндогенного происхождения, после попадания в кровоток, метаболизируется главным образом в печени и в физиологических, и фармакологических концентрациях препятствует развитию реакций свободнорадикального окисления, превосходя при этом по эффективности действия такие классические антиоксиданты как витамин Е и глутатион [18].

Принимая это во внимание, нами была изучена возможность использования мелатонина для коррекции патобиохимических проявлений экспериментального внепеченочного холестаза.

Материалы и методы

Экспериментальный внепеченочный холестаз вызывался перевязкой и последующей перерезкой желчного протока [25]. Модель часто используется в фармакологических экспериментах при изучении лекарственных препаратов гепатопротекторного профиля, так как достигается хирургическим путем без введения гепатотоксинов [4].

В эксперименте были использованы самцы белых крыс весом 180-230 г., содержащиеся на стандартном рационе вивария. Животные были разбиты на 4 группы по 8-10 крыс. Животные 2 и 4 групп подвергались хирургической операции, в ходе которой общий желчный проток перевязывался в двух местах и перерезался между лигатурами. Контролем служили “ложнооперированные” животные 1 и 3 групп, у которых вскрывали брюшную полость, однако желчный проток не перевязывали и не перерезали. Во время операции животных наркотизировали с помощью серного эфира. Выживаемость прооперированных животных в контрольной группе составляла 100%, а в опытной - 90%-100%. На следующие сутки после операции животным 3 и 4 групп ежедневно в 10⁰⁰-11⁰⁰ утра в течение всего срока внутрибрюшинно вводили мелатонин, растворенный в 0,9% NaCl, содержащем 5% этилового спирта, в дозе 1 мг на кг массы тела. Животным 1 и 2 групп соответственно ежедневно в течение всего срока вводили внутрибрюшинно раствор 0,9% NaCl, содержащего 5% этилового спирта. На 14 сутки после перерезки желчного

протока животных умерщвляли декапитацией, и все дальнейшие операции проводили при температуре 0-+4°C.

Цитозольную, митохондриальную и микросомальную фракции печени получали методом дифференциального центрифугирования, как было описано ранее [29]. В микросомальной фракции печени определяли содержание цитохрома P-450 по методу Omura T. и Sato R. [23], а также активность НАДФН: цитохром с-редуктазы [11]. Содержание малонового диальдегида (МДА) определяли в митохондриальной и микросомальной фракции [22]. Глутатион S-трансферазную активность оценивали по скорости конъюгации 1-хлор-2,4-динитробензола (1X2,4ДНБ) с восстановленным глутатионом [15], глутатионпероксидазную активность (ГП) измеряли, используя в качестве субстрата гидропероксид трет-бутила [13]. В цитозольной и митохондриальной фракциях определяли активность супероксиддисмутазы (СОД) [3] и глутатионредуктазы [10]. В цитозольной фракции определяли активность каталазы [8]. Содержание белка в цитозольной фракции определяли методом Lowry O.H. [17], в митохондриальной и микросомальной фракциях методом Peterson G.L. [24].

Результаты и их обсуждение

Внутрибрюшинное введение мелатонина вызывает улучшение общего состояния и внешнего вида животных, ускоряет процессы заживления хирургических ран и частично восстанавливает внутриклеточную антиоксидантную защиту печени холестазных животных за счет стимуляции каталазы, СОД, глутатион пероксидазы (ГП) и глутатион редуктазы (ГР) (табл.). Данный феномен может быть обусловлен индуцирующим эффектом мелатонина, о чем свидетельствует повышение активности ферментов антиоксидантной защиты у контрольных животных, получавших мелатонин (табл.). Вызывает интерес, что мелатонин оказывает более выраженное активирующее действие в случае митохондриальных СОД, глутатион S-трансферазы (ГТ) и ГР и в меньшей степени влияет на активность этих ферментов в цитозоле (таблица). Обнаруженные различия, по-видимому, обусловлены определенной тропностью мелатонина по отношению к митохондриям, поскольку максимальная внутриклеточная концентрация индоламина была обнаружена именно в этих органеллах [18]. С другой стороны не исключено, что индуцирующий эффект на изученные ферменты оказывает не сам мелатонин, а продукты его псевдопероксидазного окисления цитохромом с: АФМК, 2-гидроксимелатонин и 2,3-дигидроксимелатонин [28].

Кроме того, частичное восстановление активности исследованных ферментов в печени холестазных животных, получавших мелатонин, может достигаться за счет его способности защищать белки от окислительного повреждения. Известно, что мелатонин

предотвращает повреждение каталазы пероксильным радикалом гораздо эффективнее, чем такие классические антиоксиданты, как глутатион, аскорбат или тролокс [20]. Мелатонин также препятствует образованию карбонильных групп и фрагментации альбумина гидроксильным радикалом, генерируемым в системе аскорбат- Fe^{3+} -EDTA [26]. Согласно нашим данным мелатонин предотвращает фрагментацию и агрегацию каталазы при инкубации цитозоля печени крыс в системе медь/билирубин, что в очередной раз подтверждает высокий антиоксидантный потенциал этого индоламина (результаты не приводятся).

Амфифильность мелатонина позволяет ему защищать от активных форм кислорода (АФК) не только растворимые, но и мембраносвязанные ферменты. Так, мелатонин частично восстанавливает у холестазных животных содержание цитохрома P-450 и активность НАДФН:цитохром с-редуктазы. Обнаруженный положительный эффект, скорее всего достигается за счет антиоксидантных и мембраностабилизирующих свойств мелатонина, так как его введение ложнооперированным животным существенно не влияло на НАДФН:цитохром с-редуктазу и цитохром P-450 (табл.). В пользу этого дополнительно свидетельствует способность мелатонина предотвращать накопление МДА при инкубации микросомальной фракции печени в модельной системе медь/билирубин (результаты не приводятся), а также снижение содержания МДА в митохондриях ложнооперированных и холестазных крыс, получавших мелатонин (таблица). Показано, что степень инактивации НАДФН: цитохром P-450 – редуктазной системы коррелирует с накоплением МДА в микросомах [32]. Причем полагают, что цитохром P-450 – редуктаза является основным участком, ответственным за индукцию НАДФН-зависимых реакций ПОЛ [21], что делает его наиболее чувствительной мишенью реакционноспособных продуктов пероксидативной деградации липидов. В условиях холестаза, когда скорость накопления МДА существенна, такой механизм может обуславливать значительное снижение активности НАДФН: цитохром с – редуктазы (таблица).

В настоящее время назначение антиоксидантов является важной составной частью комплексной терапии заболеваний печени, что, учитывая важную роль окислительного стресса в их патогенезе, представляется вполне обоснованным. Вместе с тем многие как гидрофильные, так и липофильные антиоксиданты в присутствии меди (Cu(II)), накапливающейся в печени при холестазе, проявляют выраженные прооксидантные свойства. В частности известна способность водорастворимого аскорбата в присутствии Cu(II) вызывать окислительное повреждение альбумина [19]. Классический липофильный антиоксидант витамин Е (α -токоферол (α -ТН)) может инициировать окисление липопотеинов, вступая в реакцию с Cu(II) : $\alpha\text{-ТН} + \text{Cu(II)} \rightarrow \alpha\text{-Т}^\bullet + \text{Cu(I)} + \text{H}^+$ [16].

Образовавшийся при этом радикал α -токоферола взаимодействует с полиненасыщенными жирными кислотами липопротеинов. Генерация высоко реакционноспособного гидроксильного радикала была зарегистрирована также при взаимодействии с Cu(II) водорастворимого аналога α -токоферола – тролокса [9].

Таким образом, назначение классических антиоксидантов при холестазе не всегда оправдано, поскольку их применение в условиях избыточного накопления в печени меди может вызывать побочные эффекты. В тоже время мелатонин, являясь мощным антиоксидантом, не проявляет прооксидантных свойств в присутствии Cu(II) (результаты не приводятся), что делает его крайне привлекательным с точки зрения антиоксидантной терапии заболеваний печени. Очевидно, что благодаря широкому спектру биологической активности, а также

Таблица. Влияние внутрибрюшинного введения мелатонина (1 мг/ кг массы тела) на содержание МДА и активность ферментов антиоксидантной и монооксигеназной систем в печени крыс, ($M \pm SEM$)

Показатель	Животные			
	- мелатонин		+ мелатонин	
	Ложнооперированные	с перерезанным желчным протоком	Ложнооперированные	с перерезанным желчным протоком
Каталаза, мкмоль H_2O_2 /мин/мг белка	26,82±1,99	0,65±0,05***	31,78±1,92 ^{a*}	12,05±0,95 ^{b**}
СОД (цитозоль), у.е./мг белка	56,93±3,20	17,16±4,54***	69,66±7,21	69,00±12,18
СОД (митохондрии), у.е./мг белка	179,38±16,05	100,20±12,55**	255,47±22,15	151,90±13,29*
Цитохром Р-450, нмоль/мг белка	0,420±0,063	0,150±0,033 ^{a**}	0,478±0,068	0,224±0,007 ^{b,c*}
НАДФН:цитохром с- редуктаза, нмоль/мин*мг белка	172,63±5,99	61,19±7,28 ^{a***}	172,74±18,43	82,27±2,97 ^{b**}
МДА (митохондрии), нмоль/мг белка	0,52±0,06	0,78±0,04 ^{a**}	0,34±0,04 ^{b**}	0,69±0,03 ^{b***}
МДА (микросомы), нмоль/мг белка	0,37±0,02	1,27±0,06 ^{a**}	0,40±0,04	1,24±0,03 ^{b***}
ГТ (цитозоль), нмоль/мин/мг белка	502,06±4,43	260,04±20,88 ^{a***}	526,85± 27,20	427,37±21,89 ^{a*}
ГТ (митохондрии), нмоль/мин/мг белка	408,72±19,55	200,27±12,73 ^{a**}	576,29±15,47 ^{a**}	592,64±5,09 ^{a***}
ГП с t-ВНР (цитозоль), мкмоль НАДФН/мин/мг белка	684,20±123,31	321,57±79,86 ^{a**}	1106,0±180,68 ^{a*}	372,29±54,63 ^{a*}
ГП с t-ВНР (митохондрии), мкмоль НАДФН/мин/мг белка	524,5±28,73	361,91±32,58 ^{a**}	797,24±18,69 ^{a*}	760,52±35,63 ^{a**}
ГР (цитозоль), мкмоль НАДФН/мин/мг белка	23,14±1,9	9,28±0,91 ^{a***}	31,47±1,72 ^{a**}	16,07±1,57 ^{a*}
ГР (митохондрии), мкмоль НАДФН/мин/мг белка	25,15±1,9	27,47±1,7	31,36±2,3 ^{a*}	22,59±0,68

Примечание: ^a - по сравнению с ложнооперированными
^b - по сравнению с ложнооперированными животными, получавшими мелатонин
^c – по сравнению с холестазами животными

отсутствию побочных эффектов как при разовом, так и при систематическом применении [12], мелатонин, в том числе растительного происхождения, представляет значительный интерес с точки зрения создания нового поколения гепатопротекторов поливалентного действия.

Литература

1. Горкин В.З., Кривченкова Р.С. Дезаминирование некоторых биогенных моноаминов и активность сукцинатдегидрогеназы митохондрий // *Вопр. Мед. Химии.* – 1971. – Т.17. – С.65-72.
2. Влияние водно-спиртовых экстрактов из семян расторопши, душицы, лофанта и горца на систему биотрансформации ксенобиотиков в печени крыс с внепеченочным холестазом/ Е.О. Корик [и др.] // Доклады НАН Беларуси. – 2003. – Т.47, №5. – С.85-89.
3. Простой и чувствительный метод определения активности супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина/ В.А. Костюк [и др.] // *Вопр. мед. химии.* – 1990. – Т.36, № 2. – С.88-91.
4. Подымова, С.Д. Болезни печени / С.Д. Подымова. - Москва: Медицина, 1993. – 544с.
5. Семак, И.В. Корик Е.О. Динамика изменения содержания и активности глутатион-S-трансфераз печени крыс с перерезанным желчным протоком/ И.В. Семак, Е.О. Корик // Биологически активные соединения в регуляции метаболического гомеостаза: Материалы междунаrodn. научн. конф., 28-29 сент. 2000г., Гродно. В 2ч. Ч.2 / Под общ. ред. Л.И. Нефедова. – Гродно: ГрГУ, 2000. – С. 178-182.
6. Окислительный стресс в печени крыс при внепеченочном холестазе / И.В. Семак [и др.] // *Вестник БГУ.* Сер. 2. – 2001. – N.1. – С. 47-51.
7. Влияние эномеланина на перекисное окисление липидов и ферменты антиоксидантной системы в печени крыс с перерезанным желчным протоком / И.В. Семак [и др.] // *Достижения совр. биологии и биологического образования.* Мн.: Изд. центр БГУ, 2002. – С. 267-275.
8. Aebi, H. Catalase *in vitro* / H.Aebi // *Methods in Enzymol.* – 1984. – Vol. 105. – P. 121-126.
9. [Burkitt, M.J.](#), Hydroxyl radical formation from Cu(II)-trolox mixtures: insights into the pro-oxidant properties of alpha-tocopherol / [M.J.Burkitt, L.Milne](#) // *FEBS Lett.* – 1996. – Vol. 379, № 1. – P. 51-54.
10. Inhibition of glutathione disulfide reductase by glutathione / P. M. Chung [et al.] // *Arch. Biochem. Biophys.* 1991. Vol. 288, №1. P.48-53.
11. Dallner, G. Studies on the structural and enzymic organization of the membranous elements of liver microsomes / G. Dallner // *Acta pathol.microbiol. scand.* – 1963. – Vol. 166. – P. 1 – 94.
12. Protective effect of low dose of melatonin against cholestatic oxidative stress after common bile duct ligation in rats / M. Esrefoglu [et al.] // *World J. Gastroenterol.* – 2005. – Vol. 11, № 13. – P. 1951-1956.
13. Flohe, L. Assays of glutathione peroxidase / L.Flohe, W.A. Cunzler // *Methods in Enzymol.* 1984. –Vol. 105. – P.114-121.

14. Melatonin in Chinese medicinal herbs / C.Guofang [et al.] // *Annls of the New York Academy of Sciences*/ 2002. – V.957. –P. 341-344.
15. The first enzymatic step in mercapturic acid formation / W.H. Habig [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1974. – Vol. 240. – P.7130-7139.
16. Alpha-tocopherol as a reductant for Cu(II) in human lipoproteins. Triggering role in the initiation of lipoprotein oxidation / A [Kontush](#) [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1996. – Vol. 271, № 19. – P. 11106-11112.
17. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O. H.Lowry [et al.] // *J. Biol. Chem.* –1951. –Vol. 193. – P.265-275.
18. Melatonin but not vitamins C and E maintains glutathione homeostasis in t-butyl hydroperoxide-induced mitochondrial oxidative stress / M.Martin [et al.] // *FASEB J.* – 2000. – Vol. 14. – P. 1677-1679.
19. Marx, G. Site-specific modification of albumin by free radicals. Reaction with copper(II) and ascorbate / G. Marx, M. Chevion // *Biochem J.* – 1986. – Vol.236, № 2. – P. 397-400.
20. Oxidative damage to catalase induced by peroxy radicals: functional protection by melatonin and other antioxidants / J. C. [Mayo](#) [et al.] // [Free Radic. Res.](#) – 2003. – Vol. 37, № 5. – P. 543-553.
21. Superoxide generation by NADPH-cytochrome P-450 reductase: the effect of iron chelators and the role of superoxide in microsomal lipid peroxidation / L. A. Morehouse [et al.] // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1984. – Vol. 232, № 1. – P. 366-377.
22. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction / H. Ohkawa [et al.] // *Anal. Biochem.* – 1979. – Vol. 95, №2. – P. 351-358.
23. Omura, T. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature / T. Omura, R. Sato // *J. Biol. Chem.* – 1964. – Vol. 239. – P. 2370-2378.
24. Peterson, G. L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable / G. L. Peterson // *Anal. Biochem.* – 1977. – Vol. 83, №2.– P.346-356.
25. Reichen, J., Simon F.R. in *The Liver: Biology and Pathobiology* / J. Reichen, F.R. Simon (Arias I.M. et al., eds.) 3rd edn., Raven Press, New York, 1994. – P. – 1291-1326
26. Reiter, R. J. Interactions of the pineal hormone melatonin with oxygen-centered free radicals: a brief review / R. J. Reiter // *Braz. J. Med. Biol. Res.* – 1993. – Vol. 26, № 11. – P. 1141-1155.
27. Reiter, R.J. Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin / R.J. Reiter // *Prog. Neurobiol.* – 1998. – Vol. 56. – P.359-384.
28. A novel metabolic pathway of melatonin: oxidation by cytochrome C / I. Semak [et al.] // *Biochemistry.* – 2005. – Vol. 44, № 26. – P. 9300-9307.
29. Semak, I. V. The functional state of the xenobiotic metabolizing system in rat liver following chronic administration of diethylnitrosamine or its precursors / I. V. Semak, A. T. Pikulev // *Drug Metab. Drug Interact.* – 1994. – Vol. 11, № 3. – P. 237-244.
30. Experimental Cholestasis Decreases Concentration of the Class Alpha Isoenzymes of Glutathione S-transferase in Rat Liver Cytosol / I.V.Semak [et al.] // *Medical Biochemistry*, 2001, Vol. 1, pp. 285-292.
31. Chemical and physical properties and potential mechanisms: melatonin as a broad spectrum antioxidant and free radical scavenge / D.X. Tan [et al.] // *Curr. Topics Med. Chem.* – 2002. – Vol. 2. – P.181–197.
32. Wills, E. D. Effects of lipid peroxidation on membrane-bound enzymes of the endoplasmic reticulum / E. D. Wills // *Biochem. J.* – 1971. – Vol. 123, № 5. – P. 983-991.

